

Vergleich der Eignung von vier Methoden (Immunfluoreszenz antinukleärer Antikörper, indirekte Hämagglutination, Immundiffusion, Gegenstromimmunelektrophorese) zur Differenzierung und Identifizierung von nukleäres Antigen

Von H.-J. Lakomek, N. Sablotni

Medizinische Klinik und Poliklinik C

H.-J. Hagedorn

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie und

H. L. Krüskemper

Medizinische Klinik und Poliklinik C
der Universität Düsseldorf

(Eingegangen am 21. Februar/17. Mai 1983)

Zusammenfassung: Die Eignung von 4 Methoden (Immunfluoreszenz antinukleärer Antikörper (ANA), indirekte Hämagglutination, Immundiffusion und Gegenstromimmunelektrophorese) zum Nachweis und zur Differenzierung von Antikörpern gegen extrahierbares nukleäres Antigen (ENA) in Seren von 197 Patienten mit entzündlich rheumatischen Erkrankungen wurde analysiert. Die Gegenstromimmunelektrophorese zeigte die höchste Sensitivität und Spezifität für die Erfassung und Differenzierung von Antikörpern gegen Ribonucleoprotein (RNP), nukleäres Glykoprotein (Sm) und Antikörpern, die bei Sicca-(*Sjögren*)-Syndrom (SS-B, Ha) beschrieben wurden. Diese Methode ist wie die Immundiffusion geeignet, die immunologische Identität von ENA-Antikörperseren zu Referenzseren darzustellen. Der Nachweis der immunologischen Identität in der Gegenstromimmunelektrophorese wurde mit einem neuentwickelten Testsystem (Pool-Verfahren) durchgeführt. Diese Methode zeigt im Vergleich zum Verfahren nach *Kurata & Tan* ((1976) *Arthritis Rheum.* 19, 574–580) Vorteile hinsichtlich der Identifizierbarkeit und Praktikabilität.

Evaluation of 4 methods (immunofluorescence of antinuclear antibodies (ANA), indirect haemagglutination, immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis) for the differentiation and identification of antibodies against extractable nucleic antigen (ENA)

Summary: The performance of four methods (immunofluorescence of antinuclear antibodies (ANA), indirect haemagglutination, immunodiffusion and counterimmunoelectrophoresis) in the detection and differentiation of the antibodies against extractable nucleic antigen (ENA) was analysed with the aid of sera from 197 patients suffering from inflammatory diseases. Counterimmunoelectrophoresis showed the highest sensitivity and specificity for the detection and differentiation of antibodies against ribonucleoproteins (RNP), nuclear glycoprotein (Sm) and antibodies, which occur in Sicca (*Sjögren*) syndrome (SS-B, Ha). This method, like immunodiffusion, is suitable for demonstrating the common immunological identity of the ENA-antibody sera and the reference sera. The proof of immunological identity using the counterimmunoelectrophoresis was performed with the newly developed test system (pool procedure). This method, as compared to the procedure of *Kurata & Tan* ((1976) *Arthritis Rheum.* 19, 574–580) has certain technical advantages, and gives better identification.

Einführung

Für entzündlich rheumatische Erkrankungen scheinen Antigen-Antikörper-Systeme nicht nur eine beträchtliche diagnostische Relevanz zu haben, sondern zudem eine Bedeutung für die Einschätzung der Prognose und des Krankheitsverlaufes. Zur Charakterisierung und Unterscheidung von Kernantigenen wird deren Empfindlichkeit gegenüber nukleolytischen und proteolytischen Enzymen sowie Hitze herangezogen. Zum anderen wird die Krankheitsspezifität des entsprechenden Antikörpers beurteilt. So ist der n-DNA-Antikörper auf Grund seiner Inzidenz von 70% (1) in Sera von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses eine wichtige diagnostische Kenngröße, wobei seine Konzentration mit der Krankheitsaktivität eng korreliert (2–5). Weitere Kernantikörper, die bei systemischem Lupus erythematoses im Serum gefunden werden, sind der Desoxyribonucleoprotein (DNP)- und der Sm-Antikörper. Letzterer ist nahezu ausschließlich beim systemischem Lupus erythematoses nachweisbar und wird daher als „Marker“-Antikörper gewertet (1, 6, 7). Ribonucleoprotein (RNP)-Antikörper finden sich dagegen bei verschiedenen entzündlich rheumatischen Erkrankungen. Besonders hohe Titer werden in Sera von Patienten mit „Mixed Connective Tissue Disease“ gemessen (1, 8, 9, 10). *Alspaugh* und Mitarbeiter (11) fanden eine hohe Inzidenz von SS-A-Antikörpern (70%) und SS-B-Antikörpern (48%) in Sera von Patienten mit Sicca-Syndrom. Ebenfalls beim Sicca-Syndrom und auch beim systemischem Lupus erythematoses beschrieben *Akizuki* und Mitarbeiter (12) den Ha-Antikörper. Nach Meinung dieser Autoren sind der Ha- und der SS-B-Antikörper immunologisch identisch. *Tan* und Mitarbeiter (13) berichteten kürzlich über den Nachweis des Scl-70-Antikörpers, eines „Marker“-Antikörpers für die progressive systemische Sklerodermie.

Die genannten Antikörper können mittels der Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten erfaßt werden, eine Unterscheidung der Antikörperspezifitäten ist aber nur bedingt möglich.

So bewirkt der Desoxyribonucleoprotein (DNP)-Antikörper an Zellkernen ein homogenes Muster in der Immunfluoreszenz, der nDNA-Antikörper dagegen ein ringförmiges („rim“, oder „peripheral“) Immunfluoreszenzmuster (14, 15). Ein fleckförmiges („speckled“) Fluoreszenzbild wird von Antikörpern gegen verschiedene lösliche Kernantigene (ENA-Antikörper) hervorgerufen (Tab. 1). Zu diesen gehören der RNP-, der Sm-, der SS-B-, der Ha- und der Scl-70-Antikörper (6, 11, 12, 13, 16). Zur Differenzierung der für das „speckled“ Immunfluor-

reszenzmuster verantwortlichen Antikörper ist ein Extrakt aus Kaninchen- oder Kalbsthymuszellkernen (ENA-Extrakt) (9, 17) geeignet, der die Antigene dieser fünf Antikörper enthält (15). In den letzten Jahren wurden unter Verwendung dieser Extrakte Methoden zum Nachweis der genannten Antikörper entwickelt, u. a. eine Doppeldiffusionsmethode in Agarosegel nach *Ouchterlony* (6, 11, 12, 13, 16) die indirekte Hämagglutination (1, 9, 18) sowie die Gegenstromimmunelektrophorese (17, 19, 20). Eine weitere Möglichkeit zur Erfassung von RNP-Antikörpern bietet eine Modifikation der Immunfluoreszenzmethode, die antinukleäre Antikörper-Ribonuclease (ANA-RNase)-Technik (10, 21).

Die vorliegende Arbeit vergleicht diese vier Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen Thymuszellkernextrakt (ENA-Antikörpern) und versucht, die einzelnen Verfahren zu werten hinsichtlich

1. der Möglichkeit, mehrere Antigen-Antikörper-Systeme auf einmal zu erfassen (Differenzierbarkeit)
2. der Identifizierbarkeit der Antikörper
3. der Empfindlichkeit der Methoden
4. Ihrer Praktikabilität für die Anwendung in einem Routinelabor,
5. einer Strategie für den Einsatz dieser vier Methoden in einem Routinelabor.

Material und Methoden

Es wurden Sera von 197 Patienten mit entzündlich rheumatischen Erkrankungen untersucht: systemischer Lupus erythematoses (n = 46); „Overlap“-Syndrom (n = 14); progressive systemische Sklerodermie (n = 48); Spondylitis ankylosans (n = 36); rheumatoide Arthritis (n = 50); Verdacht auf Immunerkrankung (n = 3); außerdem Sera von Kontrollpersonen (n = 23). Die Sera wurden bis zur Untersuchung eingefroren (–20 °C) und vor dem Test dekompentiert (56 °C/30 min).

Diagnosen

Patienten mit systemischem Lupus erythematoses und rheumatoide Arthritis erfüllten die jeweiligen Klassifikationskriterien der American Rheumatism Association (22, 23). Die Diagnose progressive systemische Sklerodermie wurde gestellt, wenn typische Hautveränderungen und eine Organbeteiligung vorlagen (24). Ein „Overlap“-Syndrom wurde diagnostiziert bei gleichzeitigem Auftreten von mindestens zwei der folgenden Krankheitsbilder: systemischer Lupus erythematoses, progressive systemische Sklerodermie, Dermato-Polymyositis, *Sjögren*-Syndrom. Patienten mit Spondylitis ankylosans entsprachen den von *Moll & Wright* (25) beschriebenen klinischen und radiologischen Charakteristika. Kontrollpersonen waren gesunde Klinikangestellte (Alter unter 40 J.).

Tab. 1. Darstellung und Charakterisierung der Antigene von Antikörpern mit „speckled“-Immunfluoreszenzmuster.

Antigen	Biochemische Charakterisierung	Antigenvorkommen in phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung	Antinukleärer Antikörper			Muster in der Immunfluoreszenz	Empfindlichkeit des Antigens gegen		Hitzebestabilität des Antigens bei 37 °C	Hitzebestabilität des Antigens bei 56 °C	Methoden zum Nachweis des Antikörpers	Vorkommen der Antikörper vorwiegend bei
			RNase	DNase	Trypsin							
Sm	In phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung lösliches, DNA-freies nukleäres Glykoprotein mit geringem RNA-Gehalt	Kalbs- und Kaninchen-thymus	Ø	Ø	partiell	Speckled	Ø	Ø	>24 h	>1 h	Gegenstromimmunelektrophorese, Immundiffusion, Indirekte Hämagglutination	Systemischem Lupus erythematodes
RNP	In phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung lösliches nukleäres Ribonucleoprotein	Kalbs- und Kaninchen-thymus	+	Ø	+	Speckled	Ø	Ø	8 h	<30 min	Gegenstromimmunelektrophorese, Immundiffusion, Indirekte Hämagglutination	Mixed Connective Tissue Disease und anderen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen
Scl 70	In phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung lösliches basisches nukleäres Protein (Komplex aus Non-Histon-Polypeptiden)	Kaninchenthymus, Rattenleber HEP ₂ -Zellen	Ø	Ø	+	Speckled	Ø	Ø	>30 min	<30 min	Immundiffusion	Progressiver systemischer Sklerodermie
Ha	nicht bekannt	Kalbs- und Kaninchen-thymus, Rattenleber	Ø	Ø	+	Speckled	Ø	Ø	~4 h	<30 min	Gegenstromimmunelektrophorese, Immundiffusion	Sjögren-Syndrom, systemischem Lupus erythematodes
SSS-B	nicht bekannt	Wil ₂ -Zellen, diversen menschlichen Organen, Kaninchenthymus	Ø	Ø	+	Speckled	Ø	Ø	stabil	stabil	Gegenstromimmunelektrophorese, Immundiffusion	Sjögren-Syndrom, systemischem Lupus erythematodes

Es hat sich in der Literatur als zweckmäßig eingebürgert, unbekannte zelluläre Antigene mit den ersten beiden Buchstaben des Namens des Patienten zu bezeichnen, dessen Serum zur Identifizierung des Antigens benutzt wurde (z. B. Sm, Ro, Ha). Sobald diese Antigene besser charakterisiert sind, sollen diese Bezeichnungen durch genauere (z. B. nukleäres Ribonucleoprotein (RNP)) ersetzt werden (12).

Es bedeuten:

Sm, Ha: ein Antigen, benannt nach den Anfangsbuchstaben des Patienten, bei dem der entsprechende Antikörper gefunden wurde.

Sm ist ein nukleäres Glykoprotein

Ha wurde bei Sicca (Sjögren) Syndrom beschrieben

RNP: Ribonucleoprotein

Scl 70: ein Antigen mit $M_r = 70\,000$, identifiziert mittels Sera bestimmter Patienten mit Sklerodermie (Scl)

SS-B: ein Antigen B, charakterisiert mittels Sera bestimmter Patienten mit Sjögren-Syndrom (SS)

Referenzsera

Referenzsera mit Antikörpern gegen das RNP-, Sm- und SS-B-/Ha-Antigen, die mit den von Dr. E. M. Tan benutzten identisch sind, wurden uns freundlicherweise vom Center for Disease Control, Atlanta, USA, zur Verfügung gestellt. Das Serum MZI wurde von E. S. Maxwell & T. E. Martin, University of Chicago, Department of Biology, als anti-RNP-, das Serum AGR als anti-RNP- und anti-Sm-haltig charakterisiert (persönliche Mitteilung). Beide dienten ebenfalls als Vergleichssera.

Extrakt und Extraktbehandlung

Als Antigenquelle diente ein lyophilisierter Extrakt aus Kaninchenthy-mus (Pel-Freez-Biologicals, Rogers, Arkansas).

Zur Antigendifferenzierung wurde der Extrakt mit Ribonuclease (RNase) (Serva Feinbiochemica, Heidelberg), Desoxyribonuclease (DNase) (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey) oder Trypsin (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) inkubiert. Die RNase- und DNase-Behandlung erfolgte nach Kurata & Tan (17), die Trypsinbehandlung nach Keiser & Weinstein (20), wobei hier nach der Inkubation dem Enzym-Substrat-Gemisch eine der Trypsinaktivität entsprechende Menge an Trypsin-inhibitor (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) zugesetzt wurde. Die Hitzebehandlung des Kaninchentymusextraktes erfolgte bei 56 °C für 30 min.

Alle Patientensera wurden in mehreren Testansätzen an verschiedenen Tagen mit jedem der folgenden Verfahren untersucht.

Indirekte Hämagglutination

Für den Hämagglutinationstest wandten wir eine Modifikation der Methode von Sharp und Mitarbeitern an (9). Eine Suspension gewaschener defibrinierter Schafserythrocyten (40 ml/l) in Veronalpuffer (pH 7,4) mit einem Tanningehalt von 25 mg/l wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend einmal in Veronalpuffer gewaschen. Aus dem Sediment wurde eine neue Suspension (330 ml/l) hergestellt und mit gleichen Volumina des unbehandelten bzw. vorbehandelten Kaninchentymusextrakt (Proteingehalt 10 g/l) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde viermal mit Veronalpuffer, der normales Kaninchenserum (Behringwerke Marburg) im Verhältnis 1:150 enthielt, gewaschen. Die beladenen Erythrocyten wurden in kaninchenserumhaltigem Puffer so resuspendiert, daß die Suspension bei einer Wellenlänge von 578 nm und einer Schichtdicke von 1 cm eine Transmission von 24% ergab.

Zur Absorption unspezifischer Antikörper wurden die Testsera zunächst mit gleichen Volumina eines nicht antigenbeladenen Erythrocytenkonzentrates bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die absorbierten Sera in Zehnerschritten mit kaninchenserumhaltigem Puffer verdünnt und jeweils 50 µl auf Mikrotiterplatten (Flow Laboratories, Meckenheim) übertragen. Nach Zugabe von 50 µl der Gebrauchssuspension mit sensibilisierten Erythrocyten erfolgte die Inkubation der Testansätze über Nacht bei 40 °C. Das Testergebnis wurde als positiv gewertet, wenn in einer Serumverdünnung von mindestens 1:100 ein deutliches Agglutinationsbild zu erkennen war. Ein Abfall des mit indirekter Hämagglutination ermittelten Titers bei Verwendung von RNase-behandeltem Kaninchentymusextrakt um mindestens zwei Titerstufen sprach für das Vorliegen eines RNP-Antikörpers, nach RNase-Inkubation bestehende Resttiter $\geq 1:100$ zeigten Sm-Antikörper an.

Immendiffusion

Die Immendiffusion wurde durchgeführt wie von Dorsch und Mitarbeitern (26) beschrieben. 0,75 g Agarose L (Behringwerke, Marburg) wurde in 100 ml phosphat-gepufferter isotoner NaCl-Lösung (0,15 mol/l; pH 7,2) gelöst und je 12 ml davon auf Glasplatten (8,3 cm \times 9,3 cm) gegossen. In das erkaltete Gel wurden

Löcher für Serum bzw. Antigen gestanzt mit einem Durchmesser von 4 mm und einem Abstand zwischen Antigen- und Antikörperloch von 3 mm. Die Protein-Konzentration des Kaninchentymus-Extraktes betrug 20 g/l Puffer, die Sera wurden unverdünnt sowie verdünnt eingesetzt. Die Platten wurden 4 Tage in der feuchten Kammer bei 40 °C inkubiert, anschließend in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und mit Coomassie-Blue gefärbt.

Gegenstromimmunelektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte nach der Methode von Kurata & Tan (17). 0,6 g Agarose H (LKB, Bromma, Schweden) wurde in 100 ml 1:1 mit destilliertem Wasser verdünntem Michaelispuffer (0,025 mol/l; pH 8,2) gelöst, und je 10 ml davon auf Glasplatten (8,3 cm \times 9,3 cm) gegossen. In das erkaltete Gel wurden zwei parallele Lochreihen gestanzt (Durchmesser 4 mm; Reihenabstand 10 mm). In die kathodennahe Lochreihe wurde unbehandelter oder vorbehandelter Kaninchentymus-Extrakt der Protein-Konzentration 10 g/l Puffer gegeben. Unverdünntes oder verdünntes Test- und Referenzserum wurde in die anodennahe Reihe gefüllt. Die Durchführung der Gegenstromimmunelektrophorese erfolgte mit einem Multiphor®-Elektrophoresesystem (LKB, Bromma, Schweden) bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm über 1 Stunde. Die Platten wurden über Nacht in der feuchten Kammer inkubiert, anschließend mit Natriumcitratlösung (50 g/l) gewaschen und mit Coomassie-Blue gefärbt.

Immunfluoreszenzmethoden

(Antinukleärer Antikörper/Antinukleärer Antikörper-RNase)

Für die Bestimmung des Titers und Fluoreszenzmusters der Antinukleären Antikörper (ANA) in der indirekten Immunfluoreszenz wurden Rattenleberschnitte (Hyland-Travenol, München) verwendet. Die RNase-Vorbehandlung des Antigensubstrates erfolgte nach der von Rosenthal angegebenen Methode, wobei die Organschnitte mit RNase (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) der Konzentration 0,1 g/l während 30 min bei 37 °C inkubiert wurden. Ein Serum wurde als RNP-Antikörper-haltig gewertet, wenn es bei einem „speckled“ Fluoreszenzmuster und einem Ausgangstiter von 1:1280 oder mehr einen Titerabfall auf RNase-behandelten Schnitten von mindestens drei Stufen zeigte (21).

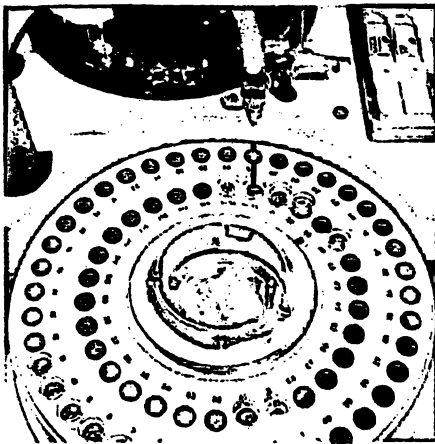
Ergebnisse

Der Vergleich der Antinukleären Antikörper (ANA)-Immunfluoreszenztiter mit den Antikörperbefunden in der Hämagglutination, der Immundiffusion und der Gegenstromimmunelektrophorese ergibt, daß sich bei 76 Sera mit einem Immunfluoreszenz-Titer von $\geq 1:320$ in 25 Fällen (32%), bei 144 Sera mit einem ANA-Titer $< 1:320$ oder negativem Immunfluoreszenz-Test dagegen nur zweimal (1,4%) Antikörper gegen Thymusextrakt mit mindestens einer Methode fanden (Abb. 1). Eine Assoziation zwischen einem hohen Immunfluoreszenz-Titer und einer bestimmten Antikörperspezifität konnte hier nicht beobachtet werden.

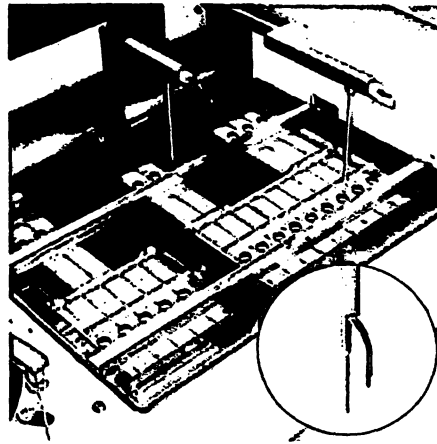
Die Kriterien von Rosenthal zum Ribonucleoprotein (RNP)-Antikörpernachweis (Immunfluoreszenz-Titer von $\geq 1:1280$, „speckled“ Immunfluoreszenzmuster, Titerabfall um mindestens 3 Stufen auf RNase-behandelten Organschnitten) erfüllten 10 Sera (Tab. 2).

**Viele Gründe
sprechen für das System
nach Maß:**

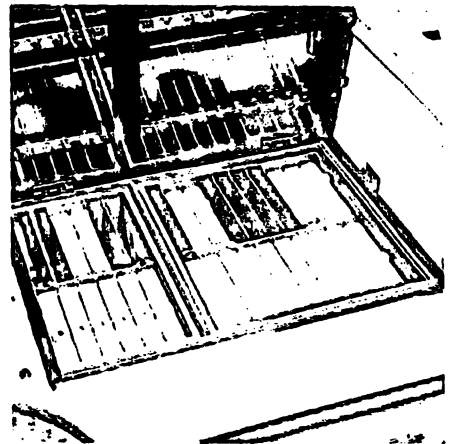
HITACHI 705



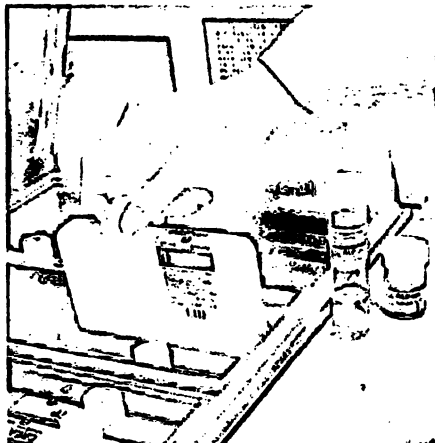
Routine, Eilanalysen mit
Elektrolyten



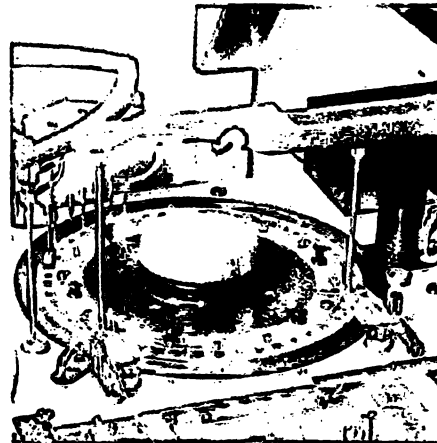
Sensorkontrolliertes
Pipettiersystem



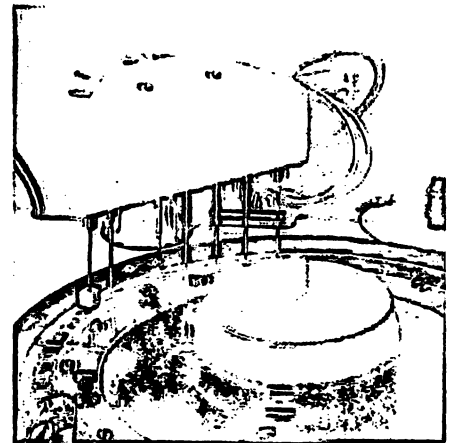
Integrierte Kühleinheit
für Reagenzien



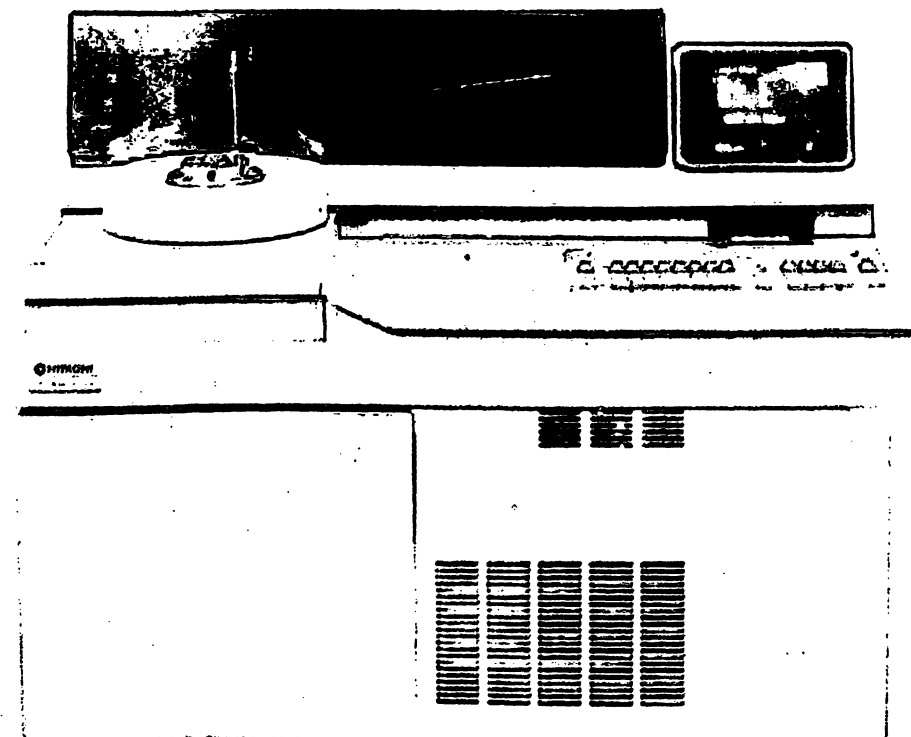
Maßgerechte
Packungsvarianten



Reaktionsrotor
mit 48 Meßküvetten



Wascheinheit mit integriertem
automatischem Küvetten-
abgleich



**HITACHI 705 –
die anspruchsvolle
Gerätetechnik
mit der hohen
Wirtschaftlichkeit**

Bitte um Aufnahme in
Ihren Hitachi-Infoservice

Name

Straße

PLZ/Ort



Boehringer Mannheim Gmbh
Abt. M-DPG
Postfach 310120
6800 Mannheim 31



Walter de Gruyter
Berlin · New York

K. Fotherby
S. B. Pal
(Editors)

Hormones in Normal and Abnormal Human Tissues

Volume 1

1980. 17 cm x 24 cm. XIV, 658 pages with figures and tables.
Hardcover. DM 145,-; approx. US \$69.25
ISBN 3 11 008031 1

Volume 2

1981. 17 cm x 24 cm. XII, 552 pages with figures and tables.
Hardcover. DM 135,-; approx. US \$64.50
ISBN 3 11 008541 0

Volume 3

1982. 17 cm x 24 cm. Approx. 500 pages with figures and tables.
Hardcover. Approx. DM 120,-; approx. US \$57.25
ISBN 3 11 008616 6

Hormones in Normal and Abnormal Human Tissues is a **three-volume monograph** dealing with the circulating levels, the pathological and therapeutic conditions and the factors controlling the secretion of non-polypeptide, protein and steroid hormones.

An attempt has been made to place emphasis on the concentration of the various hormones in tissues; where they are produced and where they might localize and produce an effect, and how these levels are modified under various circumstances.

M. K. Agarwal
(Editor)

Hormone Antagonists

1982. 17 cm x 24 cm. IX, 734 pages. Numerous illustrations.
Hardcover. DM 180,-; approx. US \$85.75
ISBN 3 11 008613 1

This book groups together under one single cover antagonists for those hormones where antagonism has been documented specifically and with a certain degree of certitude. The major emphasis has been delineation of anti-hormone activity at the level of the hormone receptor but other aspects, such as antibody mediated antagonism and inhibition of synthesis, have been included to indicate other possible levels of inhibition of hormone activity. Clinical aspects, too, have been covered where they were documented with certitude.

It is felt that the book represents a major new reference source for years to come. Scientists, medical academicians, and advanced graduate students may use the book as a departing point for further pursuit of their own field. Involved research workers will find the volume of much interest since it provides data not published elsewhere. The book may also be used as a text volume to indicate the diversity and the wealth of information on the subject of hormone antagonism both in the basic research and in clinical medicine. Photo-offset method of publication assures expediency before specialized articles obsolete novelty.

Prices are subject to change without notice.

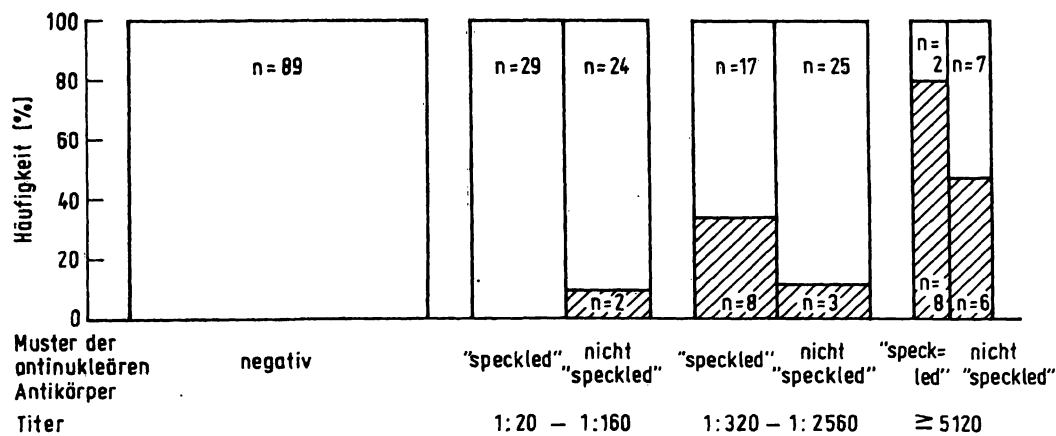


Abb. 1. Häufigkeit des Nachweises der Antikörper gegen Kaninchenthymus-Extrakt in Abhängigkeit von Titer und Fluoreszenzmuster. Offene Säulen: kein Nachweis; schraffiert: Nachweis mit mindestens einer Methode.

Die vergleichende Untersuchung dieser Sera in der Gegenstromimmunelektrophorese und der indirekten Hämagglutination zeigte aber, daß in zwei Fällen ausschließlich ein Ha- bzw. ein Sm-Antikörper nachgewiesen werden konnte.

Zwei weitere Sera waren negativ und zweimal konnten neben einem RNP-Antikörper zusätzlich noch andere Antikörperspezifitäten erfaßt werden. Zudem fanden sich bei Anwendung der Elektrophorese oder Hämagglutination 9 RNP-Antikörpersera, die nicht die von *Rosenthal* geforderten Bedingungen erfüllten.

Indirekte Hämagglutination

Für die Test-Durchführung erwiesen sich in *Alsever*-Lösung suspendierte, 7 bis 10 Tage alte Schafserythrocyten als am besten geeignet. Es erfolgte eine Modifizierung der Enzymbehandlung, indem der Kaninchenthymus-Extrakt erst nach Inkubation mit RNase auf die Erythrocyten gegeben wurde. Dieses Vorgehen ergab identische Ergebnisse im Vergleich mit der von *Sharp* und Mitarbeitern (9) angegebenen Technik, in der die RNase-Behandlung erst nach Beladung der Erythrocyten mit dem Extrakt vorgenommen wird.

Von den in der Hämagglutination eingesetzten Testsera ergaben 13 (Immunfluoreszenz-Titer $\geq 1:320$) einen positiven Reaktionsausfall mit Titern zwischen $1:10^2$ und $1:10^6$. Aufgrund des Reaktionsverhaltens vor und nach RNase-Behandlung des Kaninchenthymus-Extraktes enthielten 6 Sera einen RNP-, 4 einen Sm- und 3 weitere Sera einen RNP- sowie einen Sm-Antikörper (Tab. 2).

Immundiffusion

Von den in der Immundiffusion getesteten Sera ($n = 220$) zeigten 17 eine Einzelbande, nur bei einem Testserum trat eine Doppelbande auf. In Abhängigkeit vom Verhalten der Sera gegenüber dem enzym- und hitzebehandelten Extrakt konnten Antikörper gegen vier Kernantigene unterschieden werden (Tab. 2).

Von 11 in der Immundiffusion charakterisierten RNP-Antikörpersera zeigten 8 mit einem anti-RNP Referenzserum immunologische Identität, 2 Sera Nichtidentität und ein Serum partielle Identität. Ein anti-SS-B-Serum und 2 anti-Ha-Sera verhielten sich ebenfalls fraglich partiell identisch mit dem anti-RNP-Serum. Somit war in 6 von 14 Fällen keine sichere Zuordnung der Sera zu einer Antikörperspezifität möglich.

Gegenstromimmunelektrophorese

Mit diesem Verfahren konnten die in Tabelle 2 aufgeführten Antikörperspezifitäten nachgewiesen werden. Die Identität der Antikörper mit den Referenzsera wurde in einem von uns für die Gegenstromimmunelektrophorese entwickelten Pool-Verfahren überprüft. Nebeneinander wurden an der Anodenseite der Elektrophoreseplatte aufgetragen:

1. das Referenzserum,
 2. das zu testende Serum
 3. eine Mischung aus gleichen Volumina des unverdünnten Test- und Referenzserums.
- (beide 1:2 mit Puffer verdünnt),

Tab. 2. Ergebnisse der Patientensera (Initialen in der ersten Spalte aufgeführt) mit positivem Reaktionsausfall in mindestens einer der vier Methoden (Immunfluoreszenz-RNase Test, indirekte Hämagglutination, Immundiffusion, Gegenstromimmunelektrophorese). Die waagerechten Pfeile kennzeichnen Sera, die die Kriterien von *Rosenthal* erfüllen.

Patient	Diagnose	Immunfluoreszenz antinukleärer Anti- körper		Gegenstromimmunelektrophorese		Identifikation mittels Pooling		Immundiffusion		Indirekte Hämagglutination	
		Titer Muster	Titer nach RNase- Einwirkung	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Titer nach RNase- Einwirkung	Titer nach RNase- Einwirkung
BBA	Systemischer Lupus erythematoses	1:80000 speckled	→1:320	RNP-AK 1:256	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK 1:256	ja	1:10 ⁶	Ø
GDÖ	„Overlap“-Syndrom	1:20480 speckled	→1:2560	RNP-/Ha-AK 1:16/1:16	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK 1:32	ja	1:10 ⁵	1:10 ³
AGR	„Overlap“-Syndrom	1:10240 speckled	→1:320	RNP-AK/Sm-AK 1:1024/1:256	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK/Sm-AK 1:256/1:16	ja	1:10 ⁶	1:10 ⁴
EKL	„Overlap“-Syndrom	1:10240 speckled	→1:40	RNP-AK 1:16	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK 1:16	ja	1:10 ⁴	Ø
HEL	„Overlap“-Syndrom	1:5120 speckled	→1:320	RNP-AK 1:64	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK 1:32	ja	1:10 ⁵	Ø
MZI	„Overlap“-Syndrom	1:2560 speckled	→1:20	RNP-AK 1:16	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK 1:32	ja	1:10 ⁴	Ø
KLA	Systemischer Lupus erythematoses	1:2560 speckled	1:640	RNP-AK 1:16	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK 1:32	ja	1:10 ⁴	1:10 ²
UKL	Systemischer Lupus erythematoses	1:1280 speckled	1:1280	RNP-AK/Sm-AK 1:4/1:64	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK 1:16	ja	1:10 ³	1:10 ³
EDE	„Overlap“-Syndrom	1:5120 speckled	1:5120	Ha-AK 1:256	RNP-AK Ø	RNP-AK Ø	RNP-AK partiell?	Ha-AK 1:64	partiell?	n.d.	n.d.
UST	Systemischer Lupus erythematoses	1:5120 speckled	→1:640	Ha-AK 1:1024	RNP-AK Ø	RNP-AK Ø	RNP-AK partiell?	Ha-AK 1:32	partiell?	Ø	Ø
BHE	Systemischer Lupus erythematoses, rheumatoide Arthritis	1:5120 homogen	1:320	RNP-AK 1:16	RNP-AK Ø	RNP-AK Ø	RNP-AK partiell?	RNP-AK 1:8	partiell?	Ø	Ø
MWI	Systemischer Lupus erythematoses	1:5120 homogen	1:1280	SSB-AK 1:16	RNP-AK Ø	RNP-AK Ø	RNP-AK Ø	SSB-AK 1:8	partiell?	Ø	Ø
WKA	Verdacht auf Immunerkrankung	1:1280 speckled	1:640	unbekannter AK 1:4	RNP-AK Ø	RNP-AK Ø	RNP-AK Ø	Ha-AK 1:8	?	Ø	Ø
EKO	Systemischer Lupus erythematoses rheumatoide Arthritis	1:1280 hom/thr	1:40	RNP-AK 1:4	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK 1:4	n.d.	n.d.	n.d.
MSC	Progressive systemische Sklerodermie	1:80000 homogen	1:40000	RNP-AK/Sm-AK n.d./n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	RNP-AK 1:128	n.d.	Ø	Ø

Tab. 2., Fortsetzung

Patient	Diagnose	Immunfluoreszenz antinukleärer Anti- körper		Gegenstromimmunelektrophorese		Identifikation mittels Pooling		Methode von Kurata et al. (17)		Immuddiffusion		Indirekte Hämagglutination	
		Titer Muster	Titer nach RNase- Einwirkung	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Antikörpertiter, enzymatisch	Titer nach RNase- Einwirkung	Titer nach RNase- Einwirkung
MTE	Systemischer Lupus erythematoses	1:320 homogen	0	Ha-AK 1:2	RNP-AK 0	RNP-AK 0	RNP-AK 0	RNP-AK 0	Ha-AK unverdünn	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CPL	Systemischer Lupus erythematoses	1:40 homogen	0	RNP-AK/SSB-AK 1:4/1:64	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK 1:16	?	0	0	0
IKU	Systemischer Lupus erythematoses	1:320 speckled	1:160	RNP-AK 1:2	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	RNP-AK +	0	—	1:10 ³	1:10 ²	1:10 ²
PST	Rheumatoide Arthritis	n.d.	n.d.	Sm-AK unverdünn	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	—	1:10 ²	1:10 ²	1:10 ²
ZSA	Verdacht auf Immunerkrankung	1:320 homogen	1:160	SSB-AK 1:2	RNP-AK 0	RNP-AK 0	RNP-AK ?	RNP-AK ?	0	—	0	0	0
MKÄ	„Overlap“-Syndrom	1:320 speckled	0	SSB-AK 1:2	RNP-AK 0	RNP-AK 0	RNP-AK 0	RNP-AK 0	0	—	0	0	0
WSC	Verdacht auf Immunerkrankung	1:20 homogen	1:20	Sm-AK 1:2	RNP-AK 0	RNP-AK 0	RNP-AK ?	RNP-AK ?	0	—	0	0	0
MZW	Progressive systemische Sklerodermie	1:1280 speckled	→0	Sm-AK 1:2	RNP-AK 0	RNP-AK 0	RNP-AK 0	RNP-AK 0	0	—	0	0	0
DNE	Systemischer Lupus erythematoses, rheumatoide Arthritis	1:5120 homogen	1:2560	Sm-AK 1:16	n.d.	n.d.	RNP-AK ?	RNP-AK ?	0	—	0	0	0
AEW	„Overlap“-Syndrom	1:2560 Thready	1:2560	0	—	—	—	—	RNP-AK 1:8	?	0	0	0
COR	„Overlap“-Syndrom	1:5120 homogen	1:5120	0	—	—	—	—	0	—	1:10 ²	0	0
MSI	Systemischer Lupus erythematoses	1:640 thready	1:160	0	—	—	—	—	0	—	1:10 ²	0	0
SPÜ	Systemischer Lupus erythematoses, rheumatoide Arthritis	1:320 speckled	0	0	—	—	—	—	0	—	1:10 ³	1:10 ²	1:10 ²
HST	„Overlap“-Syndrom	1:20480 speckled	→1:1280	0	—	—	—	—	0	—	0	0	0
LZE	„Overlap“-Syndrom	1:2560 speckled	→1:320	0	—	—	—	—	0	—	0	0	0

RNP-AK = Antikörper gegen Ribonucleoprotein

Ha-AK = Antikörper gegen das mit Ha bezeichnete Antigen (Tabelle 1)

Sm-AK = Antikörper gegen das mit Sm bezeichnete Antigen (Tabelle 1)

SSB-AK = Antikörper gegen das mit B bezeichnete, bei Sjögren-Syndrom nachgewiesene Antigen (Tabelle 1)

n.d. = nicht durchgeführt

Alle einzeln aufgetragenen Sera zeigten Präzipitationsbanden. Trat im Vergleich zum Testserumanatz im Serumpool eine zusätzliche Bande auf, wurde dieser Befund als immunologische Nichtidentität mit dem Referenzserum gewertet. Fand sich im Serumpool nur eine Bande, wurde das Testresultat wie folgt kontrolliert:

1. das unverdünnte Referenzserum wurde mit unterschiedlichen Testserumverdünnungen zusammengegeben,
2. das unverdünnte Testserum wurde mit Verdünnungen des Referenzserum gepoolt.

Zeigte sich in einer der Kombinationen eine zusätzliche Bande, so sprach dies für immunologische Nichtidentität, anderenfalls wurde die Identität beider Antikörper angenommen (Abb. 2).

In 11 von 12 mittels der Elektrophorese charakterisierten anti-RNP-Sera ergab das Pool-Verfahren den Hinweis auf Identität mit dem anti-RNP-Referenzserum. Nur ein Serum zeigte Nichtidentität. Für die 9 monospezifischen Nicht-RNP-Antikörpersera bestätigte sich die Nichtidentität mit dem RNP-Antikörper.

Der Vergleich der Poolmethode mit der von Kurata & Tan (17) angegebenen Elektrophorese-Technik der Antikörperidentifizierung ergab in 16 von 21 Fällen eine Übereinstimmung beider Verfahren in der Abgrenzung von Identität und Nichtidentität

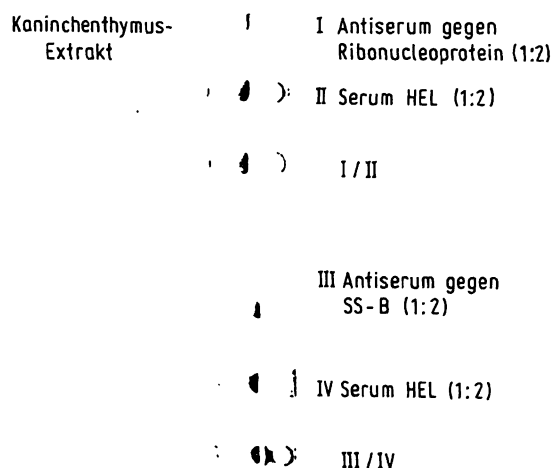


Abb. 2. Identifikation von Antikörpern mittels des Pool-Verfahrens in der Gegenstromimmunelektrophorese: Die Identität des Antikörpers in Serum HEL mit dem RNP-Antikörper ist oben dargestellt (eine gemeinsame Bande der gepoolten Sera). Die Nichtidentität zum SS-B-Antikörper ergibt sich aus dem Auftreten einer Doppelbande im Serumpool (unten).

zum anti-RNP-Serum. Die übrigen 5 Sera zeigten im Pool-Verfahren klar Nichtidentität, während die Methode von Kurata & Tan in diesen Fällen keine eindeutige Befundinterpretation zuließ. Dreimal schien eine partielle Identität mit dem anti-RNP-Referenzserum vorzuliegen.

Vergleich von Hämagglutination und Immundiffusion

Nur bei den 7 Sera mit RNP-Antikörpertitern von mindestens 1:1000 im Hämagglutinationstest konnte auch in der Immundiffusion ein RNP-Antikörper nachgewiesen und die immunologische Identität mit dem anti-RNP-Referenzserum bestätigt werden. 2 RNP-Antikörpersera mit einem durch indirekte Hämagglutination ermittelten Titer von 1:100 präzipitierten dagegen nicht.

Von 7 mit der Hämagglutination gefundenen Sm-Antikörpersera zeigte nur eines (durch indirekte Hämagglutination ermittelter Titer nach RNase-Behandlung 1:10000) in der Immundiffusion eine mit dem anti-Sm-Referenzserum identische Präzipitationslinie. Die übrigen 6 Sera mit durch indirekte Hämagglutination ermittelten Resttitern von 1:100 oder 1:1000 reagierten in der Immundiffusion nicht wie Sm-Antikörpersera. Andererseits fand sich bei 6 im Hämagglutinationstest negativen Sera in der Immundiffusion eine Bande.

Während im Hämagglutinationstest nur zwei Antikörperspezifitäten unterschieden werden können, ermöglicht die Immundiffusion, Antikörper gegen mindestens vier Kernantigene zu differenzieren (RNP, Sm, SS-B, Ha). Der Vergleich beider Methoden ergab zudem, daß niedrigtitrige RNP- und Sm-Antikörper mit Hämagglutinationstest-Titern unter 1:1000 nur in der indirekten Hämagglutination erfaßt werden.

Vergleich von Hämagglutination und Gegenstromimmunelektrophorese

Alle 9 Sera mit einem Hämagglutinationstest-Titer $\geq 1:1000$ bildeten Präzipitationsbanden, wobei die Antikörper-Titer in beiden Methoden eng miteinander korrelierten (Tab. 2). Von 4 Sera mit einem Hämagglutinationstest-Titer unter 1:1000 zeigte nur eines eine Reaktion in der Gegenstromimmunelektrophorese. Andererseits ermöglicht die Elektrophorese die Identifizierung von 11 Sera, die im Hämagglutinationstest negativ waren (Tab. 2).

Vergleich von Immundiffusion und Gegenstromimmunelektrophorese

In der Immundiffusion und Gegenstromimmunelektrophorese konnten weitgehend identische Antikörpertiter gemessen werden; nur in 3 Sera fanden sich in der Elektrophorese wesentlich höhere Titer. Bemerkenswert ist aber, daß 7 Sera, die in der Elektrophorese Antikörpertiter unter 1:32 hatten, in der Immundiffusion nicht präzipitieren. Darüberhinaus konnten in 4 Sera, die in der Immundiffusion nur eine Bande zeigten, in der Gegenstromimmunelektrophorese Doppelbanden gesehen und somit zusätzlich weitere Antikörperspezifitäten erfaßt werden.

Nur ein Serum zeigte ein gegensätzliches Verhalten, d.h. dieses reagierte nur in der Immundiffusion (Tab. 2).

Diskussion

In der durchgeführten Studie konnte in 16 von 64 Sera (25%) mit einem „speckled“ Fluoreszenzmuster ein Antikörper gegen Kaninchentymus-Extrakt gefunden werden. Ein vergleichbares Ergebnis wurde von *Farber & Bole* (27) berichtet. Bedeutender als der Fluoreszenztyp scheint für den Nachweis von Antikörpern gegen Kaninchentymus-Extrakt der Immunfluoreszenz-Titer zu sein, da in 25 von 76 Sera (32%) mit einem Immunfluoreszenz-Titer von 1:320 oder höher ein Thymusextrakt-Antikörper unabhängig vom Fluoreszenzmuster gesehen wurde (Abb. 1). Obwohl in Sera mit einem Immunfluoreszenz-Titer von $\geq 1:320$ und „speckled“ Fluoreszenzmuster die Häufigkeit der Antikörper gegen Kaninchentymus-Extrakt maximal war (16/35 = 46%), muß die Einbeziehung dieses Fluoreszenzmusters als Auswahlkriterium für den Einsatz von Hämagglutination, Immundiffusion und Gegenstromimmunelektrophorese kritisch gesehen werden, da von den 27 Sera mit Antikörpern gegen Kaninchentymusextrakt zwar 16 ein „speckled“ Muster in der Immunfluoreszenz aufweisen, sich aber auch in 11 Sera ein nicht-„speckled“ Muster findet. *Tan* (28) stellte dar, daß gleichzeitig vorhandene Kernantikörper mit „rim“ oder „homogenem“ Fluoreszenzmuster das Muster von Antikörpern gegen lösliche Kernantigene überdecken und diese somit dem Nachweis entgehen können. Die Berücksichtigung des Immunfluoreszenz-Titers von $\geq 1:320$ erhält noch einen höheren Stellenwert dadurch, daß 25 von 27 anti-Thymus-Extrakt-Sera diese Bedingung erfüllen.

Der Nachweis von RNP-Antikörpern mit dem von *Rosenthal* (21) beschriebenen Immunfluoreszenzverfahren ist trotz der Praktikabilität dieser Methode nur bedingt möglich. Einerseits konnte nur in 6 von 10 Sera, die den Kriterien von *Rosenthal* genügten, der RNP-Antikörperbefund mit anderen Verfahren bestätigt werden, andererseits konnte aber mittels Gegenstromimmunelektrophorese und Hämagglutination ein RNP-Antikörper auch in 9 Sera nachgewiesen werden, die die Bedingungen von *Rosenthal* nicht erfüllten. RNP-Antikörper sind durch die Immunfluoreszenz-RNase-Technik allein nicht sicher identifizierbar. Auch *Jonsson & Norberg* (29) berichteten über eine weniger gute Korrelation der Ergebnisse von Hämagglutination und Immunfluoreszenz-RNase-Test beim Nachweis von RNP-Antikörpern.

Die Hämagglutination ist trotz einer im Vergleich zum Immunfluoreszenz-RNase-Test höheren Empfindlichkeit ebenfalls als Routineverfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Kaninchentymus-Extrakt nicht gut geeignet. Die eigenen Erfahrungen wie die anderer Autoren zeigen, daß die Qualität des gesamten Testsystems entscheidend von dem Alter der jeweils verwendeten Erythrocyten abhängt (18). Auch *Kozin & Fowler* (30) vertreten die Auffassung, daß auf Grund der technischen Probleme bei der Beladung der Erythrocyten die indirekte Hämagglutination für ein klinisches Routinelabor nicht geeignet ist. Mit diesem Verfahren ist es lediglich möglich, Antikörper zu unterscheiden, die mit der RNase-empfindlichen Fraktion des Kaninchentymus-Extraktes (= RNP-Antikörper) bzw. mit der RNase-unempfindlichen Antigenkomponente (= Sm-Antikörper) reagieren. Der Nachweis von niedrigtitrigen RNP-Antikörpern ist dann nicht möglich, wenn gleichzeitig Sm-Antikörper mit höherem Titer vorhanden sind (18, 26).

Der Vergleich der Ergebnisse der Hämagglutination mit den beiden Präzipitationsverfahren zeigt Antikörper gegen Kaninchentymus-Extrakt mittels Gegenstromimmunelektrophorese bzw. Immundiffusion in 12 Fällen, bei denen die Hämagglutination negativ ist, obwohl sie gegenüber den anderen Verfahren das empfindlichere Nachweissystem darstellt (1, 13, 18, 30). Das negative Resultat der 6 Ha/SS-B-Antikörpersera im Hämagglutinationstest (Tab. 2) ist dadurch bedingt, daß die Hämagglutination diese Antikörper nicht erfaßt (14). *Jonsson* und Mitarbeiter (31) sowie *Venables* und Mitarbeiter (32) beschrieben RNP-Antikörper, die ebenfalls in der indirekten Hämagglutination nicht nachweisbar waren, wobei als Erklärungsmöglichkeit ein Nicht-

haften des zugehörigen Antigens an der Erythrocytenmembran diskutiert wurde. Möglicherweise liegt in 4 RNP-Antikörpersera diese Antikörperspezifität vor. Eine Erklärung für die Nichterfassung der 4 Sm-Antikörpersera mittels der Hämagglutination fand sich nicht (Tab. 2).

Gegenüber der Hämagglutination haben beide Präzipitationsverfahren den entscheidenden Vorteil, daß auf Grund des Einsatzes von Referenzsera die Identifizierung von Antikörperspezifitäten möglich ist.

Die Wertigkeit der Charakterisierung von Antikörperspezifitäten auf der Basis der unterschiedlichen Enzymempfindlichkeit der eingesetzten Antigensubstrate (Organschnitte bzw. Kaninchenthymus-Extrakt) ist hier durch den direkten Vergleich mit Referenzsera überprüfbar. Der Einsatz von Referenzsera für RNP-, Sm- und Ha/SS-B-Antikörper in einer der Präzipitationsmethoden ergab bei 16 anti-Kaninchenthymusextrakt positiven Sera eine Übereinstimmung mit der enzymatischen Zuordnung, in 4 Fällen dagegen eine Diskrepanz. Diese Abweichungen und die Tatsache, daß das Scl-70-Antigen (13) und das Ha-Antigen (12) sowie das Antigen des PM-1-Antikörpers (33) die gleiche Enzym- und Hitzeempfindlichkeit aufweisen, geben dem Einsatz von Referenzsera, wie bereits von anderen Arbeitsgruppen (14, 26, 34) hervorgehoben, eine besondere Bedeutung für die eindeutige Zuordnung der gefundenen Antikörper.

Vergleicht man die Praktikabilität beider Präzipitationsverfahren, so hat die Gegenstromimmunelektrophorese dadurch Vorteile, daß hier in der Regel eine Auswertung nach wenigen Stunden möglich ist, während ein Ergebnis in der Immundiffusion erst nach einigen Tagen abgelesen werden kann.

Da die gemessenen Antikörpertiter in der Immundiffusion und der Gegenstromimmunelektrophorese weitgehend übereinstimmen, fanden wir in beiden Methoden die gleiche Empfindlichkeit für den Nachweis von Kaninchenthymusextrakt-Antikörpern. Obwohl mit der Immundiffusion und der Gegenstromimmunelektrophorese prinzipiell die gleichen Antikörperspezifitäten erfaßbar sind, konnte bei vier in der Immundiffusion als monospezifisch charakterisierten Sera mittels der Gegenstromimmunelektrophorese durch das Auftreten einer zweiten Bande ein weiterer Antikörper differenziert werden (Tab. 2).

Unter Berücksichtigung der von Stites (35) dargestellten Kriterien für die Beurteilung der immunologischen Identität von Antikörpern in der Immundiffusion zeigen 4 Sera (identisch mit dem anti-Ha/

SS-B-Referenzserum) Präzipitationsbilder, bei denen eine partielle Identität mit dem anti-RNP-Referenzserum vorzuliegen scheint, Nichtidentität aber nicht sicher ausgeschlossen werden kann. In weiteren 2 Fällen konnte auf Grund zu schwacher Präzipitationslinien keine Identifizierung vorgenommen werden.

Andererseits zeigten 8 Sera typische Bilder immunologischer Identität.

Bei der Auswertung der mit der Methode von Kurata & Tan (17) erhaltenen Ergebnisse treten ähnliche Schwierigkeiten auf (20), da auch bei diesem Verfahren die Unterscheidung von partieller Identität und Nichtidentität nicht immer möglich ist und zu schwache Präzipitationsbanden ebenfalls eine klare Identifizierung verhindern (Abb. 3).

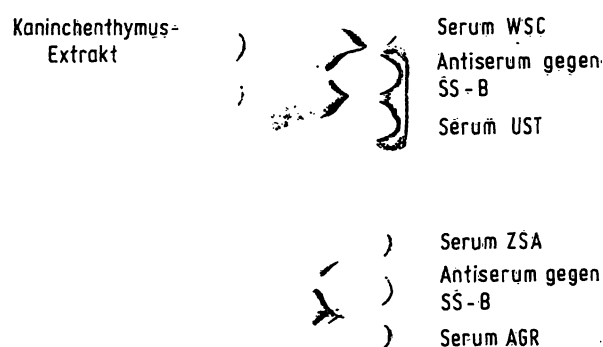


Abb. 3. Darstellung von Präzipitationsbildern im Identifikationsverfahren nach Kurata & Tan am Beispiel des SS-B-Antikörpers.

Serum UST zeigt Identität (konfluierende Banden), Serum AGR zeigt Nichtidentität (zwei nicht konfluierende Banden), Sera WSC und ZSA sind nicht sicher zuzuordnen.

Die aufgezeigte Problematik der bekannten Verfahren in der Gegenstromimmunelektrophorese und der Immundiffusion führte zur Entwicklung einer neuen Referenzmethode für die Gegenstromimmunelektrophorese, die geeignet scheint, mittels eines Pools aus Test- und Referenzserum auch bei schwachen Banden oder fraglicher partieller Identität eine Zuordnung von Antikörpern zu ermöglichen. Zwar ist die Identifizierung von Testsera mit der Technik von Kurata & Tan weniger aufwendig, da das Poolverfahren aber offenbar Nichtidentität eindeutiger darstellt, sollte es gerade bei fraglichen Befunden zusätzlich Anwendung finden. Der kombinierte Einsatz beider Methoden stellt nach unserer Meinung eine Optimierung der Identifikationsmöglichkeiten in der Gegenstromimmunelektrophorese dar, weshalb auf der Basis der dargestellten Ergebnisse dieses Vorgehen der Referenztechnik in der Immundiffusion vorzuziehen ist.

Die vergleichende Untersuchung von Immunfluoreszenz-RNase-Technik, Hämagglutination, Immundiffusion und Gegenstromimmunelektrophorese führte zu der in Tabelle 3 unter vier Beurteilungskriterien aufgelisteten Bewertung. Zusammenfassend hat diese Studie gezeigt, daß die Immunfluoreszenzmethode nach *Rosenthal* als Screening-Verfahren zum Nachweis von RNP-Antikörpern nicht geeignet ist, da insbesondere niedrigtitrige RNP-Antikörper hiermit nicht erfaßt werden. Die Hämagglutination hat auf Grund ihrer eingeschränkten Praktikabilität Nachteile für die Anwendung in einem Routinelabor, zudem werden auch hier RNP-Antikörper bei Maskierung durch gleichzeitig vorliegende höhertitrigere Sm-Antikörper nicht erfaßt. Für die Gegenstromimmunelektrophorese und Immundiffusion wurde die Bedeutung der Anwendung von Referenzsera mit bekannter Antikörperspezifität betont. Durch das Pool-Verfahren ergibt sich ein praktikabler Ansatz, die Identifizierung von Anti-

körpern gegen Kaninchenthymusextrakt ausschließlich mittels der Gegenstromimmunelektrophorese durchzuführen. Für die Erfassung und Differenzierung dieser Antikörper sind somit besonders die Immundiffusion und die Gegenstromimmunelektrophorese geeignet.

Auf der Grundlage der dargestellten Antikörpererfassung soll mittels Gegenstromimmunelektrophorese und Immundiffusion versucht werden, Beziehungen zwischen den serologischen Kenngrößen und der klinischen Symptomatik aufzuzeigen mit dem Ziel, die vielfältig beschriebenen Assoziationen von Kernantikörpern zu Diagnosen oder Krankheitscharakteristika der entzündlich rheumatischen Erkrankungen zu überprüfen.

Danksagung

Für die Überlassung einiger Sklerodermieseren danken wir Herrn Dr. T. Krieg, Universitätsklinik München.

Tab. 3. Vergleichende Darstellung von Immunfluoreszenz, indirekter Hämagglutination, Immundiffusion und Gegenstromimmunelektrophorese unter Anwendung von vier Beurteilungskriterien, wobei die Wertigkeit der Methoden von oben nach unten abnimmt.

Differenzierbarkeit	Identifizierbarkeit	Empfindlichkeit	Praktikabilität
Gegenstromimmun- elektrophorese	Gegenstromimmun- elektrophorese	Indirekte Hämagglutination	Gegenstromimmunelektrophorese
Immundiffusion	Immundiffusion	Immunfluoreszenz	Immunfluoreszenz
Indirekte Hämagglutination	—	Gegenstromimmunelektrophorese/ Immundiffusion	Immundiffusion
Immunfluoreszenz	Indirekte Hämagglutination/ Immunfluoreszenz	—	Indirekte Hämagglutination

Literatur

- Notman, D. D., Kurata, N. & Tan, E. M. (1975) *Ann. Intern. Med.* 83, 464–469.
- Adler, M. K., Baumgarten, A., Hecht, B. & Siegel, N. J. (1975) *Ann. Rheum. Dis.* 34, 444–450.
- Hughes, G. R. V. (1975) *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* 11, 42–51.
- Pincus, T., Schur, P. H., Rose, J. A., Decker, J. L. & Talal, N. (1969) *N. Engl. J. Med.* 281, 701–705.
- Schur, P. H. & Sandson, J. (1968) *N. Engl. J. Med.* 278, 533–538.
- Tan, E. M. & Kunkel, H. G. (1966) *J. Immunol.* 96, 464–470.
- Tan, E. M. (1967) *J. Clin. Invest.* 46, 735–745.
- Parker, M. D. (1973) *J. Lab. Clin. Med.* 82, 769–775.
- Sharp, G. C., Irvin, W. S., LaRoque, R. L., Velez, C., Daly, V., Kaiser, A. D. & Holman, H. R. (1971) *J. Clin. Invest.* 50, 350–359.
- Sharp, G. C., Irvin, W. S., Tan, E. M., Gould, R. G. & Holman, H. R. (1972) *Am. J. Med.* 52, 148–159.
- Alsbaugh, M. A., Talal, N. & Tan, E. M. (1976) *Arthritis Rheum.* 19, 216–222.
- Akizuki, M., Powers, R. & Holman, H. R. (1977) *J. Clin. Invest.* 59, 264–272.
- Tan, E. M., Rodnan, G. R., Garcia, I., Moroi, Y., Fritzler, M. J. & Peebles, C. (1980) *Arthritis Rheum.* 23, 617–625.
- Akizuki, M., Powers, R. & Holman, H. R. (1977) *Arthritis Rheum.* 20, 693–701.
- Nakamura, R. M. & Tan, E. M. (1978) *Hum. Pathol.* 9, 85–91.
- Mattioli, M. & Reichlin, M. (1971) *J. Immunol.* 107, 1281–1290.
- Kurata, N. & Tan, E. M. (1976) *Arthritis Rheum.* 19, 574–580.
- Nakamura, R. M., Peebles, C. L. & Tan, E. M. (1978) *Am. J. Clin. Pathol.* 70, 800–807.
- Bresnahan, B., Bunn, Ch., Snaith, M. L. & Hughes, G. R. V. (1977) *Br. Med. J.* 1, 610–611.
- Keiser, H. D. & Weinstein, J. (1980) *Arthritis Rheum.* 23, 1026–1035.
- Rosenthal, M. (1977) *Klin. Wochenschr.* 55, 31–35.
- Cohen, A. S., Reynolds, W. E., Franklin, E. C., Kulka, J. P., Ropes, M. W., Shulman, L. E. & Wallace, S. L. (1971) *Bull. Rheum. Dis.* 21, 643–648.
- Ropes, N. W., Bennett, G. A. & Cobb, S. (1958) *Bull. Rheum. Dis.* 9, 175–180.

24. Masi, A. T., Medsger, T. A., Rodnan, G. P., Fries, J. F., Altman, R. D., Brown, B. W., D'Angelo, W. A., LeRoy, E. C., MacKenzie, A. H., McShane, D. J. & Sharp, G. C. (1979) *Clinics in Rheumatic Diseases* 5, 27-48.
25. Moll, J. M. H. & Wright, V. (1973) *Ann. Rheum. Dis.* 32, 354-364.
26. Dorsch, C. A., White, G. M. & Berzofsky, R. N. (1978) *Am. J. Clin. Pathol.* 71, 333-337.
27. Farber, S. J. & Bole, G. G. (1976) *Arch. Intern. Med.* 136, 425-431.
28. Tan, E. M. (1967) *J. Lab. Clin. Med.* 70, 800-812.
29. Jonsson, J. & Norberg, R. (1978) *Scand. J. Rheumatol.* 7, 229-236.
30. Kozin, F. & Fowler, M. (1979) *Am. J. Clin. Pathol.* 71, 437-440.
31. Jonsson, J., Steiner, M. & Klein, E. (1976) *Clin. Exp. Immunol.* 25, 144-151.
32. Venables, P. J. W., Mumford, P. A. & Maini, R. N. (1981) *Ann. Rheum. Dis.* 40, 217-223.
33. Wolfe, J. F., Adelstein, E. & Sharp, G. C. (1977) *J. Clin. Invest.* 59, 176-178.
34. Northway, J. D. & Tan, E. M. (1972) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1, 140-154.
35. Fudenberg, H. H., Stites, D. P., Caldwell, J. L. & Well, J. V. (1980) *Basic and Clinical Immunology*, 343-381.

Dr. med. Heinz-Jürgen Lakomek
Medizinische Klinik C
der Universität Düsseldorf
Moorenstr. 5
D-4000 Düsseldorf